

Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-15-0375****Posttranslačné modifikácie v mitochondriách a ich úloha v patologických procesoch**Zodpovedný riešiteľ **Ing. Eva Kutejová, CSc.**Príjemca **Ústav molekulárnej biológie SAV****Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený**Ústav molekulárnej biológie SAV
Chemický ústav SAV**Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení**Department for Structural and Computational Biology, Max Perutz Labs, Vienna, Rakúsko
Mendelovo centrum genomiky a proteomiky rastlín, Stredoevropský technologický inštitút,
Masarykova univerzita Brno, Česká republika
1. lekárska fakulta Univerzity Karlovy Praha, Česká republika**Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu**

NA

Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

Kunova, N., Ondrovicova, G., Bauer, J., Bellova, J., Ambro, L., Martinakova, L., Kotrasova, V., Kutejova, E., Pevala, V.

The role of Lon-mediated proteolysis in the dynamics of mitochondrial nucleic acid-protein complexes.

(2017) Sci Rep 7(631): 1-13; DOI: 10.1038/SREP21919

Kutejova, E.

Mitochondrial Lon protease-unique structure and essential function in mammalian cells.

(2018) Integr Cancer Sci Therap 5: 1-2

Vozarikova, V., Kunova, N., Bauer, J., Frankovsky, J., Kotrasova, V., Prochazkova, K., Dzugasova, V., Kutejova, E., Pevala, V., Nosek, J., Tomaska, L.

Mitochondrial HMG-Box Containing Proteins: From Biochemical Properties to the Roles in Human Diseases.

(2020) Biomolecules 10: 1193; DOI: 10.3390/biom10081193

Kotrasova, V., Keresztesova, B., Ondrovicova, G., Bauer, J., Havalova, H., Pevala, V., Kutejova, E., Kunova, N.

Mitochondrial Kinases and the Role of Mitochondrial Protein Phosphorylation in Health and Disease.

(2021) Life 11(2), 82; DOI: 10.3390/life11020082

Uplatnenie výsledkov projektu

Projekt má charakter základného výskumu. Vzhľadom na to, že sa zaoberá proteínmi a ich modifikáciami, ktoré priamo súvisia so závažnými ľudskými ochoreniami ako sú rakovina a neurodegeneratívne choroby, napomáha lepšiemu pochopeniu patologických stavov spojených s týmito chorobami.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku (max. 20 riadkov)

Mitochondrie predstavujú esenciálne organely eukaryotických buniek, ktorých nesprávna funkcia je často spájaná so závažnými ľudskými ochoreniami ako rakovina a neurodegeneratívne ochorenia. V týchto patologických procesoch veľmi dôležitú úlohu zohráva proteolýza a posttranslačné modifikácie proteínov. Cieľom projektu bolo charakterizovať potenciálne substráty mitochondriálnej Lon proteázy a vplyv posttranslačných modifikácií na samotnú proteázu Lon a jej vybrané substráty. Tento cieľ sa nám počas trvania projektu podarilo splniť. Identifikovali sme potenciálne substráty ľudskej a kvasinkovej Lon proteázy nachádzajúce sa v mitochondriálnom nukleoide a ribozóme. Podrobnejšie in vitro štúdie ukázali, že vybrané kvasinkové proteíny Mgm101 a Abf2, ako aj ľudské proteíny Twinkle helikáza a ribozomálny proteín MrpL32, sú rozpoznávané a štiepené Lon proteázou. Zo štúdií ďalej vyplýva, že regulácia hladiny sledovaných proteínov zohráva významnú úlohu pri stabilizácii a dynamike mitochondriálneho nukleoidu.

Za účelom charakterizácie ďalších substrátov Lon proteázy sme pomocou proteomickej analýzy študovali mitochondrie kvasinky *S. cerevisiae* izolované z kmeňov s rôznym genetickým pozadím: štandardného typu, mutantov v proteolytickom a ATPázovom mieste Lon proteázy a lon delečného kmeňa. Proteomická analýza ukázala, že viaceré proteíny ovplyvnené Lon proteázou sú súčasťou komplexov dýchacieho reťazca, Fe-S klastrov, metabolických dráh a membránových proteínov. Následne sme sa bližšie venovali zmenám aktivity komplexov dýchacieho reťazca a zistili sme, že v kvasinke *S. cerevisiae* Lon proteáza výrazne ovplyvňuje aktivitu viacerých z týchto komplexov.

Za účelom charakterizácie vplyvu posttranslačných modifikácií na mitochondriálne proteíny sme exprimovali, izolovali a charakterizovali viaceré fosforylované verzie proteínu TFAM v oblastiach zodpovedných za väzbu na DNA (HMG box I a HMG box II) pripravené zámennou serínu za fosfoserín a tyrozínu za nehydrolyzovateľný analóg fosfotyrozínu (pCMF). Sledovali sme väzbu fosforylovaných verzií TFAM na DNA, ako aj ich rozpoznávanie a štiepenie ľudskou Lon proteázou. Ukázalo sa, že TFAM mutanty v oblasti HMG box I sú nestabilné a dochádza k špecifickému štiepeniu už počas expresie v *E. coli*. Pripravili sme tiež vytypované fosfomimikujúce mutanty Lon proteázy náhradou príslušného tyrozínu za glutamát resp. za fenylalanín ako negatívnu kontrolu, alebo zámennou sledovaného tyrozínu za nehydrolyzovateľný analóg fosfotyrozínu (pCMF). Ukázalo sa, že aj keď mutácie neovplyvňujú multiméru štruktúru Lon proteázy, výrazne vplývajú na jej aktivitu. Úspešne sme klonovali, exprimovali a izolovali aktívne kinázové domény vybraných tyrozín kináz, ktoré sme použili v in vitro fosforylačných reakciách vybraných mitochondriálnych substrátov. Vo viacerých prípadoch sme pomocou Western blotu a MS analýzy potvrdili ich fosforyláciu.

V rámci projektu bolo školených päť doktorandiek a päť diplomantiek, ktoré úspešne obhájili svoje diplomové práce. Výsledky získané v rámci projektu boli zhrnuté v troch vedeckých prácach publikovaných v zahraničných recenzovaných a karentovaných vedeckých časopisoch a jednom editoriáli a prezentované formou deviatich prednášok (z toho 5 pozvaných) a 14 posterov na domácich a zahraničných konferenciách.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku (max. 20 riadkov)

Mitochondria are essential eukaryotic organelles, whose dysfunction is often associated with severe human diseases like cancer and neurodegenerative disorders. Proteolysis and post-translational protein modifications play an important role in the pathogenesis of such processes. The aim of the project was to characterize the potential substrates of mitochondrial ATP-dependent protease Lon and the effects of post-translational modifications on Lon protease itself as well as its mitochondrial substrates.

The main goals of the project were successfully fulfilled. We have identified several substrates of human and yeast Lon protease from among the proteins associated with mitochondrial nucleoids and ribosomes. The more detailed in vitro studies have shown that

yeast proteins Mgm101 and Abf2, as well as human helicase Twinkle and the ribosomal protein MrpL32, were recognized by Lon protease and digested in Lon-mediated proteolysis. Moreover, we have found that the regulation of the levels of studied proteins could play an important role in the overall stability and the dynamics of mitochondrial nucleoids. To closely characterize other Lon protease substrates, a proteomic analysis of various *S. cerevisiae* mitochondria (wild-type, mutants in Lon proteolytic and ATPase domain and a Lon deletion mutant) was performed. These analyses have shown that several proteins affected by the presence of active Lon protease belonged to the respiratory chain complexes, Fe-S clusters, various metabolic pathways and membrane proteins. Particularly, we have focused on changes in the activity of respiratory chain complexes and we have found that, in *S. cerevisiae*, Lon significantly affected several of them.

To characterize the effect of post-translational modifications on mitochondrial proteins, we expressed, isolated and characterized several phosphorylated versions of TFAM with modified amino acids particularly residing in the regions responsible for its DNA binding (HMG box I and HMG box II), which were prepared by the amino-acid exchange. A serine residue was replaced by a phosphoserine, and a tyrosine exchanged for a nonhydrolyzable analogue of phosphotyrosine (pCMF). We have studied the binding of TFAM phospho-versions to DNA, as well as their recognition and digestion by human Lon protease. Here, we have found that TFAM HMG box I mutants were largely unstable and a seemingly specific cleavage has occurred already during the expression in *E. coli*. We have also prepared phospho-mimicking Lon mutants by replacing a chosen tyrosine with glutamate and phenylalanine as a negative control, and by replacing the tyrosine residue with a nonhydrolyzable analogue of phosphotyrosine (pCMF). It has been shown that although these mutations did not alter the multimeric structure of Lon protease, they significantly affected its activity. We have successfully cloned, expressed, and isolated active kinase domains of several tyrosine kinases, which were then used in *in vitro* phosphorylation reactions of various mitochondrial substrates. Western blotting and MS analysis have confirmed phosphorylation of several of them.

Within the project period, five PhD students and five graduate students, who successfully defended their diploma theses, were trained. The results obtained within the project were published in three scientific papers published in foreign peer-reviewed and CC scientific journals and one editorial, as well as presented in the form of nine lectures (incl. 5 invited) and 14 posters at several domestic and foreign conferences.